

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年11月15日 (15.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/85733 A1

(51) 国際特許分類: C07D 487/04, A61K 31/4178,
A61P 35/00, C12N 15/09 // C07H 21/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03756

(22) 国際出願日: 2001年5月1日 (01.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-140361 2000年5月12日 (12.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本
町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 弘
(SUGIYAMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒102-0081 東京都千

代田区四番町8-611 Tokyo (JP). 板東俊和 (BANDO,
Toshikazu) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本郷
5-21-10 ハイマート大樹305 Tokyo (JP). 飯田博一
(IIDA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒112-0002 東京都文京区
小石川5-31-5 ビラしんび303 Tokyo (JP). 齋藤 烈
(SAITO, Isao) [JP/JP]; 〒607-8242 京都府京都市山科
区勧修寺柴山1-21 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 佐伯憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

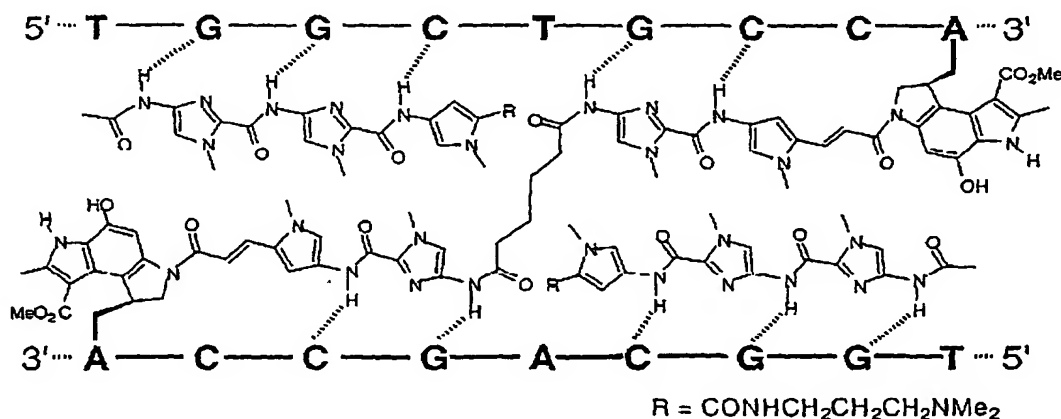
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INTERSTRAND CROSSLINKING AGENTS FOR DNA AND COMPOUNDS THEREFOR

(54) 発明の名称: DNAのインターストランドクロスリンク剤及びそのための化合物



(57) Abstract: Compounds represented by the following general formula (I) by which two DNA strands can be inter-strand-crosslinked: A-L-B-X-B-L-A (I) wherein B represents a chemical structure capable of recognizing a base sequence of a DNA; A represents a chemical structure capable of binding to one of the bases of the DNA; L represents a linker by which the chemical structures A and B can be linked to each other; and X represents a spacer by which the A-L-B components can be linked to each other. A method of interstrand-crosslinking DNA by using these compounds; and medicinal compositions containing interstrand crosslinking agents of DNA.

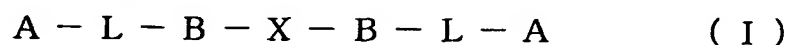
[続葉有]

WO 01/85733 A1



(57) 要約:

本発明は、一般式 (I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示し、XはA-L-Bコンポーネントを結合させるスペーサーを示す。)

で表される、DNAの2本鎖をインターストランドクロスリンクすることができる化合物に関する。

また、本発明は、前記化合物を用いるDNAをインターストランドクロスリンクする方法、DNAのインターストランドクロスリンク剤及びこれを含む医薬組成物に関する。

明 細 書

インターストランドクロスリンク剤の合成方法

技術分野

本発明は、化学合成により製造し得る化合物を用いて２本鎖DNAを同時にアルキル化し、切断し得る化合物、これらの化合物を用いたDNAのアルキル化方法、２本鎖DNAの切断方法、及び、これらの化合物を用いた医薬組成物に関する。

背景技術

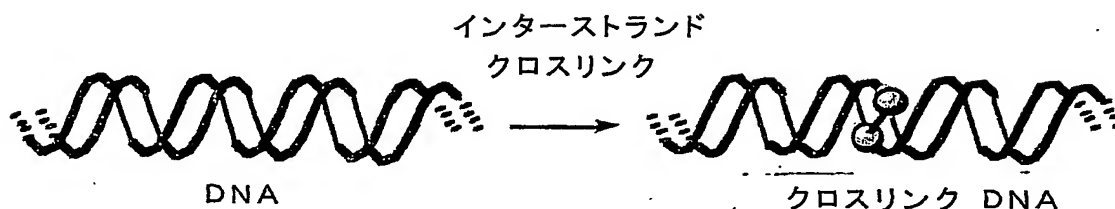
ヒトゲノムプロジェクトにより我々の「生命の設計図」である全遺伝子の塩基配列が数年内に解明されようとしている。この設計図に傷があったり、後天的に傷がはいると、病気や老化を引き起こすことが知られている。ヒトゲノムプロジェクトの進展により癌を含む多くの疾病はDNAレベルで理解されるようになり、診断、予防などを中心とした医学全体が、革命的に変化するものと考えられる。さらに、これらの疾病のDNAレベルでの理解に基づいた治療法、すなわち病因遺伝子やその産物をターゲットとした医薬品の開発への期待も大きい。基礎研究を臨床研究に活かしてゆくための橋渡しの研究はまだ、途についたばかりである。

癌についても、DNAレベルでの研究が行われているが、現在用いられている抗癌剤は、スクリーニングによって選択された抗生物質が多く、もともと癌細胞を殺すために微生物が産生したものではなく、癌の分子生物学的知見に基づいたものはほとんどない。細胞内の特定遺伝子の発現を細胞外から自由自在にコントロールすることが可能になれば、究極の遺伝子レベルでの治療法となると考えられる。

ところで、遺伝情報を担うDNAが化学的に修飾を受けると、生命維持の根幹にあたる遺伝情報が損なわれ、細胞の突然変異や死滅が引き起こされる。また、正常細胞中のDNAへの共有結合による修飾は、がん化の原因となっていること

が知られている一方で、逆にがん細胞中のDNAに作用することで、抗がん剤としても利用することができる。

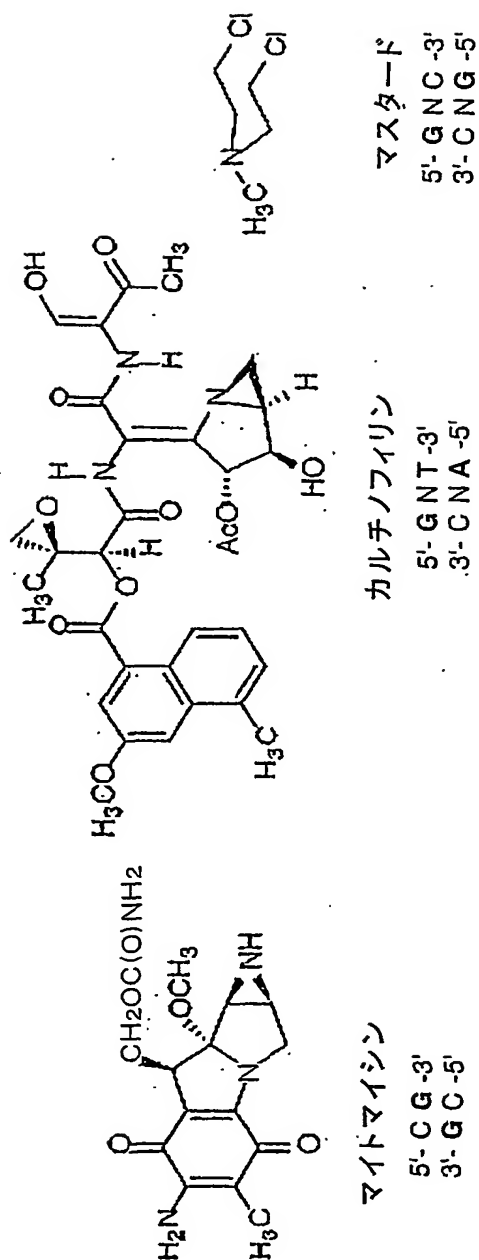
DNAの二本鎖をクロスリンクさせる次式



で示されるようなインターストランドクロスリンク反応は、DNAの複製を完全に阻害することが様々な系で確認されており、一本鎖のアルキル化と比較して生体に対して非常に強い作用を有していることが知られている (S.R.Rajski and R.M.Williams, Chem. Rev., 98, 2723-2795(1998).)。

例えば、ファージの失活には平均1.3等量のインターストランドクロスリンク化が起これば充分であるのに対し、単純な一本鎖のアルキル化では280等量のアルキル化剤を必要とするとされている (P.D.Lawley, J.H.Lethbridge, P.A.Edwards, K.V.Shooter, J. Mol. Biol., 39, 181(1969).)。

典型的なインターストランドクロスリンク反応を起こす抗がん性抗生物質としてマイトマイシンやカルチノフィリンAが知られている。また、これまでにピゼレシンを代表とするDNAインターストランドクロスリンクする化合物が数多く合成されている。DNAインターストランドクロスリンク反応を起こすことが報告されている代表的な化合物としては、次に示すマイトマイシン、カルチノフィリンAやナイトロジェンマスタードなどが知られている。



これらのマイトマイシンやナイトロジェンマスタード (mechlorethamine) などは、有効な抗がん剤として現在も臨床で利用されている。

現在までに様々なインターストランドクロスリンク剤の塩基配列特異性が詳細

に調べられている (a) S.-J.Lee, F.C.Seaman, D.Sun, H.Xiong, R.C.Kelly, L.H.Hurley, J. Am. Chem. Soc., 119, 3434-3442(1997); b) J.T.Millard, R.J.Spencer, P.B.Hopkins, Biochemistry, 37, 5211-5219(1998); c) T.Fujiwara, I.Saito, H.Sugiyama, Tetrahedron Lett., 40, 315-318(1999).)。しかし、それらの化合物の抗がん性とインターストランドクロスリンク剤の塩基配列選択性との相関については全く明らかにされていない。さらに、任意の塩基配列でインターストランドクロスリンクする化合物の分子設計には成功していない。また、これまでに合成されているDNAインターストランドクロスリンク剤は一般的に反応の効率が著しく低い。例えば、DNA中の5'-GNC塩基配列に対してクロスリンク能を有することが知られているマスタードによるインターストランドクロスリンク体は使用しているDNAに対してわずかに数%しか生成しているにすぎない (Y.-H.Fan and B.Gold, J. Am. Chem. Soc., 121, 11942-11946(1999).)。

従って、効率よいDNAインターストランドクロスリンク剤の開発が極めて重要になってきている。

発明の開示

本発明は、効率よいDNAインターストランドクロスリンク剤、そのための化合物、及びそれを用いた医薬組成物を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物のインターストランドクロスリンクをポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて解析した実験結果を示す、図面に代わる写真である。

第2図は、2組のDNA対を用いて、本発明の化合物のインターストランドクロスリンク反応を解析した実験結果を示す、図面に代わる写真である。

第3図は、本発明の化合物(7a)とImImPyを用いて形成されたインターストランドクロスリンク体の化学構造を示すものである。

第4図は、種々のトリアミドを併用して本発明の化合物のインターストランドクロスリンク反応を解析した実験結果を示す、図面に代わる写真である。

第5図は、種々の長さのDNAを用いて本発明の化合物のインターストランド

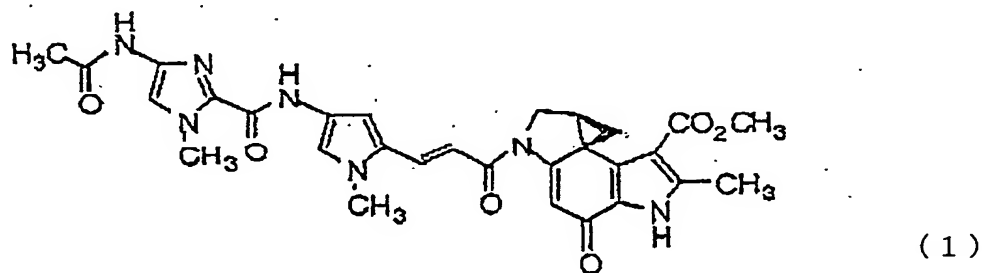
クロスリンク反応を解析した実験結果を示す、図面に代わる写真である。

第6図は、本発明の化合物(7a)及びImImPyの種々の濃度におけるクロスリンキング反応の結果を示す、図面に代わる写真である。

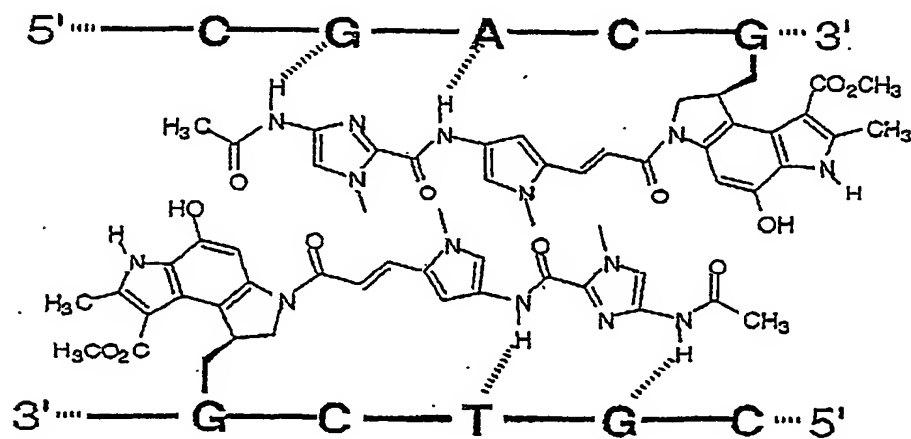
第7図は、本発明の化合物(7a)及びImImPyを用いた場合の種々の条件下におけるクロスリンキング収率をグラフ化したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、すでにDNA塩基配列認識能をもつピロールイミダゾールジアミド部とデュオカルマイシンセグメントの間にビニル基を導入した次式(1)



で表されるハイブリット分子(1)のDNAアルキル化能を解析してきた。このハイブリット分子(1)はホモダイマーを形成して次式で表されるような、



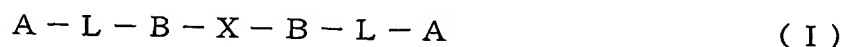
DNA中の特定の塩基配列に対して選択的にダブルアルキル化することを明らかにしてきた。この化合物は、ビニル基をリンカーLとするA-L-B-R型

(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示し、Rはアルキル基などの末端基を示す。)

の構造を有する分子である(特願平11-83591号参照)。

そこで、本発明者らは、この型の分子を基本として検討してきたところ、この型の分子を異なる長さのスペーサーで連結した化合物が効率よいDNAインターストランドクロスリンク能を有する化合物であることを見出した。

本発明は、一般式(I)

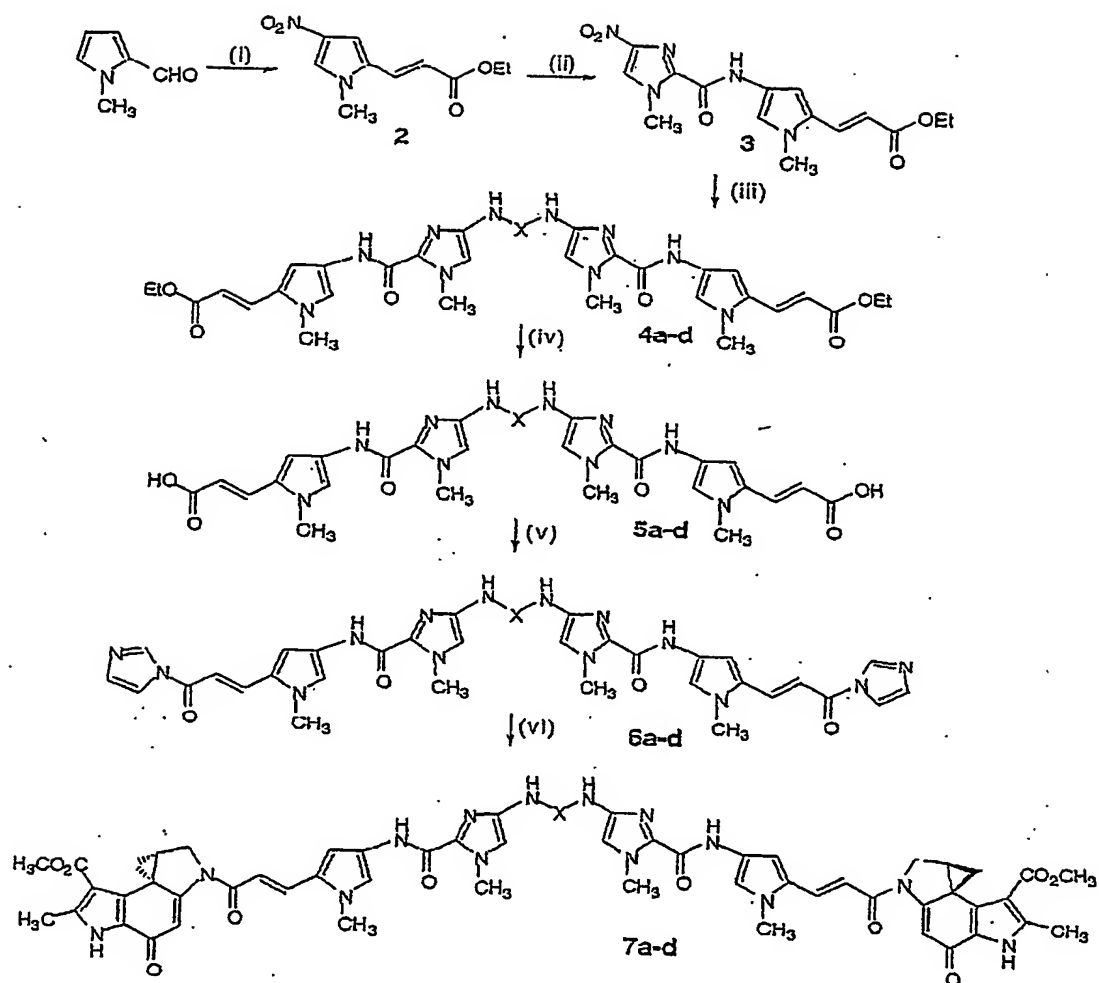


(式中、各々のBはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、各々のAはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示し、XはA-L-Bコンポーネントを結合させるスペーサーを示す。)

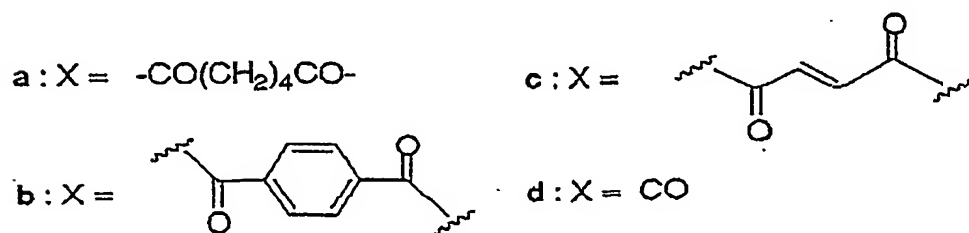
で表されるDNAの2本鎖をインターストランドクロスリンクすることができる化合物に関する。

また、本発明は前記化合物を用いるDNAをインターストランドクロスリンクする方法、DNAのインターストランドクロスリンク剤、及びこれを含有してなる医薬組成物に関する。

本発明者らは、インターストランドクロスリンク能を有する化合物を開発する目的で、例えばハイブリット分子(1)を異なる長さのスペーサーで連結した化合物(7a-d)を、次に示すスキーム、



(式中、Xは、



を示す。)

に従って合成した。化合物（7 a - d）の合成は、ジアミド誘導体（3）にそれぞれ対応するスペーサーとなる活性化したカルボニル化合物を縮合させることにより行った。

まず、N-メチル-2-ピロールアルデヒドを硝酸などでニトロ化した後、 $(EtO)_2P(O)CHCO_2Et$ などのウイティッヒ型の試薬を用いてエステル体（2）とする。得られたエステル体（2）を $NaBH_4$ などの金属水素化物などで還元してアミノ体とし、これに1-メチル-3-ニトロ-5-トリクロロアセチルイミダゾールを反応させてイミダゾール-ピロール化合物（3）とする。これを前記と同様な方法によりニトロ基を還元してアミノ基とし、これに目的物に応じた酸ハロゲン化物、またはカルボニルジイミダゾール（CDI）を反応させることにより二量体化合物（4 a - d）とする。次いで、両末端のエステル基を加水分解して遊離カルボン酸体（5 a - d）とし、これをCDIを用いて活性アミド体（6 a - d）とした後、これに抗生物質DU86のセグメントA部分を反応させて目的の化合物（7 a - d）とした。

この合成法は、同種の対称二量体の合成に対して応用可能な汎用性の高い手法であり、本発明の化合物はこの方法に準じて製造することができる。

本発明を前記した化合物（7 a - d）を例にして、具体的に説明する。

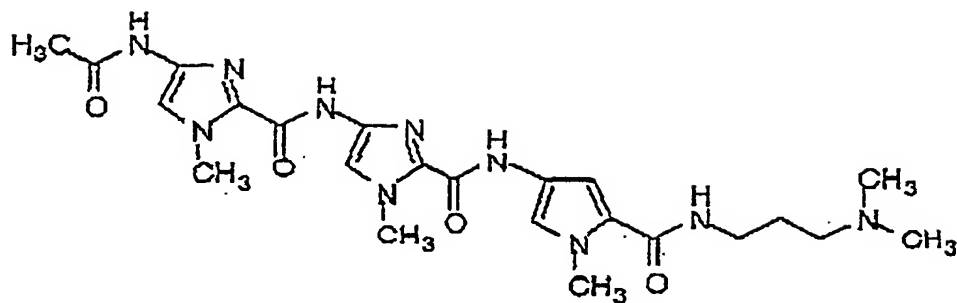
これらの化合物を用いた2本鎖DNAのインターストランドクロスリンク反応を次の18塩基及び15塩基のDNA対を用いて実験した。

5' - TTACAGTGGCTGCCAGCA - 3' (ODN-18)

3' - GTCACCGACGGTCGT - 5' (ODN-15)

このODN-18の5'末端側をテキサスレッド（TXRed）で標識したヌクレオチドをTXR-18と呼ぶことにする。

また、この実験には補助試薬として次式、



で表される化合物（この化合物を本明細書では、ImImPyという。）を用いた。このImImPyは、本明細書における「DNAの塩基配列を認識できる化学構造を有する物質」として使用された。

前記したDNAに、本発明の化合物（7a-d）、及び必要によりImImPyを添加して、DNAオリゴマーに対する化合物（7a-d）のインターストランドクロスリンク反応について、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析を行った。

結果を第1図に図面に代わる写真として示す。第1図の、

レーン1はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）のみの場合を示し、

レーン2はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）にImImPy（100 μ M）を添加した場合を示し、

レーン3はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）に化合物（7a）（50 μ M）を添加した場合を示し、

レーン4はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）に化合物（7a）（50 μ M）及びImImPy（100 μ M）を添加した場合を示し、

レーン5はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）に化合物（7b）（50 μ M）及びImImPy（100 μ M）を添加した場合を示し、

レーン6はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）に化合物（7c）（50 μ M）及びImImPy（100 μ M）を添加した場合を示し、

レーン7はTXR-18（3 μ M）とODN-15（6 μ M）に化合物（7

d) ($50 \mu\text{M}$) 及び ImImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示す。

その結果、化合物 (7 a) は単独では反応はほとんど観察できなかったが (レーン 3)、 ImImPy が存在すると、出発原料の DNA フラグメント $\text{TXR}-18$ は泳動度の低いバンドに変化した (レーン 4)。他のスパーサーをもつ化合物 (7 b-d) では、化合物単独でも ImImPy を併用してもレーン 4 で観察されたような泳動度の低いバンドは殆ど生成しなかった (レーン 5、6、7)。これらの事実は化合物 (7 a) と ImImPy を併用した場合に極めて特異的な DNA オリゴマー $\text{TXR}-18$ に対する反応が起こったことを示している。

次に、先に観察されたバンドがインターストランドクロスリンク体由来のものであることを確認するために、上のストランド ($\text{TXR}-18$) と下のストランド ($\text{TXR}-18\text{R}$) を別々にラベルしたオリゴマーからなる 2 組の DNA 対を用いた実験を行った。即ち、前記の $\text{TXR}-18$ と $\text{ODN}-15$ の対と、次に示す $\text{ODN}-15\text{R}$ と $\text{TXR}-18\text{R}$ との対を用いた。

5' - CAGTGGCTGCCAGCA - 3' (ODN-15R)

3' - GTCACCGACGGTCGTATT - 5' (ODN-18R)

使用した $\text{TXR}-18\text{R}$ は、前記した $\text{ODN}-18\text{R}$ の 5' 末端側をテキサスレッド (TXRed) で標識したヌクレオチドである。

さらにこの実験には標品として次のヌクレオチド $\text{TXR}-14$ 及び $\text{TXR}-14\text{R}$ を用いた。

5' - TTACAGTGGCTGCC - 3' (ODN-14)

3' - CCGACGGTCGTATT - 5' (ODN-14R)

これらの塩基配列はいずれも $\text{ODN}-18$ 又は $\text{ODN}-18\text{R}$ の 5' 末端側の塩基配列と同じになるように設計されている。 $\text{TXR}-14$ は、前記した $\text{ODN}-14$ の 5' 末端側をテキサスレッド (TXRed) で標識したヌクレオチドであり、同様に、 $\text{TXR}-14\text{R}$ は $\text{ODN}-14\text{R}$ の 5' 末端側をテキサスレッド (TXRed) で標識したヌクレオチドである。

この結果を第 2 図に図面に代わる写真として示す。第 2 図の

レーン 1 は、 $\text{TXR}-18$ ($3 \mu\text{M}$) と $\text{ODN}-15$ ($6 \mu\text{M}$) のみの場合を示し、

レーン2は、TXR-18 ($3\mu\text{M}$)とODN-15 ($6\mu\text{M}$)に化合物(7a) ($50\mu\text{M}$)及びImImPy ($100\mu\text{M}$)を添加した場合を示し、

レーン3は、前記レーン2において、さらに90℃で20分加熱処理した後、90℃で20分間ピペリジン処理した場合を示し、

レーン4は、前記レーン3において、さらに37℃で2時間アルカリ脱リン酸化酵素処理した場合を示し、

レーン5は、標品のTXR-14を示し、

レーン6は、TXR-18R ($3\mu\text{M}$)とODN-15R ($6\mu\text{M}$)のみの場合を示し、

レーン7は、TXR-18R ($3\mu\text{M}$)とODN-15R ($6\mu\text{M}$)に化合物(7a) ($50\mu\text{M}$)及びImImPy ($100\mu\text{M}$)を添加した場合を示し、

レーン8は、前記レーン7において、さらに90℃で20分加熱処理した後、90℃で20分間ピペリジン処理した場合を示し、

レーン9は、前記レーン8において、さらに37℃で2時間アルカリ脱リン酸化酵素処理した場合を示し、

レーン10は、標品のTXR-14Rを示す。

この実験により、インターストランドクロスリンク体と考えられる新たな生成物を確認した(レーン2及び7)。これに対し、加熱処理、ピペリジン処理を行うと、切断されたフラグメントが得られた(レーン3及び9)。さらに、このフラグメントをAP (alkaline phosphatase) 処理すると泳動度が減少した(レーン4及び8)。この生成物は別に合成した標品とポリアクリルアミドゲル電気泳動で同一物であることを確認した(レーン5及び10)。

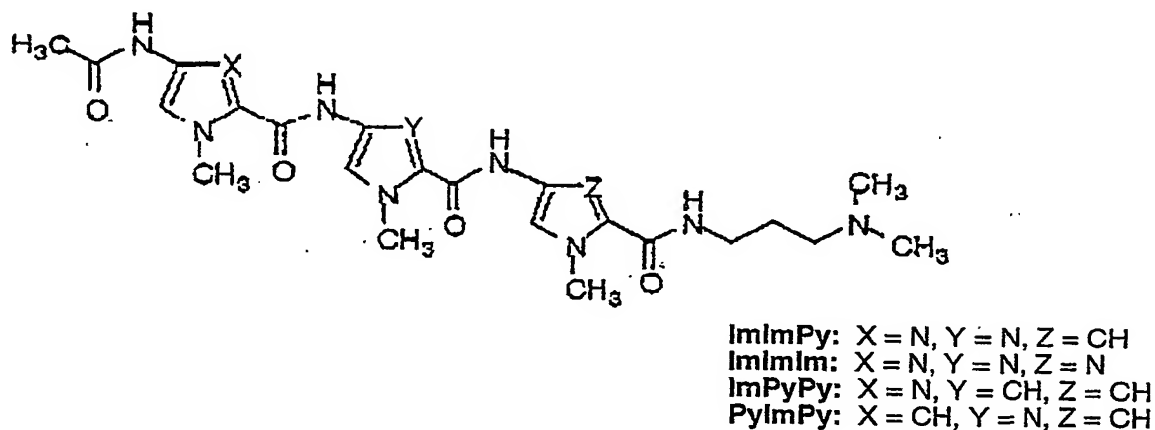
この実験結果は、化合物(7a)とImImPyによって、DNAオリゴマー上の2個所のアデニン部位で配列選択的にアルキル化されていたことを示している。つまり、反応によって泳動速度の大きな変化が観察された事実と併せて考えれば、ほぼ定量的にDNAに対するインターストランドクロスリンク反応が進行することが確認された。

これらの結果、ピロール-イミダゾールポリアミドCPIコンジュゲート体(7a)はピロール-イミダゾールの塩基配列認識のルール(a) P.B.Dervan, e

t al., Nature, 282, 111-115(1998); b) T.Fujiwara, Z.-F.Tao, Y.Ozeki, I.Saito, A.H.-J.Wang, M.Lee, H.Sugiyama, J. Am. Chem. Soc., 121, 7706-7707 (1999). 参照) に従ったトリアミドの存在下のみDNAを効率よくインターストランドクロスリンクすることが明らかとなった。化合物(7a)とImImPyによるインターストランドクロスリンク体の構造を第3図に示す。

次に、インターストランドクロスリンク体の塩基配列特異性を検討した。

この化合物(7a)とImImPyによるインターストランドクロスリンクの配列特異性を検討するために、ImImPyと他の3種のトリアミド存在下での化合物(7a)のクロスリンク反応に変化を調べた。この実験で使ったトリアミドの構造を次に示す。



即ち、ImImPyは、X=Nで、Y=Nで、Z=CHのものであり、

ImImImは、X=Nで、Y=Nで、Z=Nのものであり、

ImPyPyは、X=Nで、Y=CHで、Z=CHのものであり、

PyImPyは、X=CHで、Y=Nで、Z=CHのものである。

この結果を、第4図に図面に代わる写真として示す。第4図の

レーン1は、TXR-18 (3 μM) とODN-15 (6 μM) のみの場合を示し、

レーン2は、TXR-18 ($3 \mu\text{M}$) とODN-15 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及びImImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示し、

レーン3は、TXR-18 ($3 \mu\text{M}$) とODN-15 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及びImImIm ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示し、

レーン4は、TXR-18 ($3 \mu\text{M}$) とODN-15 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及びImPyPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示し、

レーン5は、TXR-18 ($3 \mu\text{M}$) とODN-15 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及びPyImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示す。

この結果、ImImImを用いた系 (レーン3) においても効率は若干低下するもののクロスリンク体の生成が明確に観察された。しかし、他のトリアミドを用いた系 (レーン4及び5) では、クロスリンク体の生成はほとんど確認することはできなかった。これらの結果は、第3図に示すモデルに基づいて任意の配列でDNAのインターストランドクロスリンク反応が行える可能性を示している。

さらに、インターストランドクロスリンク反応の最適条件の検討を行った。

化合物 (7a) とImImPyによるインターストランドクロスリンク反応における最適の塩基配列の間隔を調べる実験を行うために次の塩基対を用いた実験を行った。



5' 末端側のTXRedは、テキサスレッドでの標識を示す。

$n=0$ の場合の、上段のものをTXR-17と称し、下段のものをODN-14と称する。 $n=1$ の場合の、上段のものをTXR-18と称し、下段のものをODN-15と称する。 $n=2$ の場合の、上段のものをTXR-19と称し、下段のものをODN-16と称する。 $n=3$ の場合の、上段のものをTXR-20と称し、下段のものをODN-17と称する。

この結果を、第5図に図面に代わる写真として示す。第5図の

レーン1は、 $n=0$ のもので、TXR-17 ($3 \mu\text{M}$) とODN-14 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及びImImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示し、

レーン 2 は、 $n = 1$ のもので、TXR-18 ($3 \mu\text{M}$) と ODN-15 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及び ImImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示し、

レーン 3 は、 $n = 2$ のもので、TXR-19 ($3 \mu\text{M}$) と ODN-16 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及び ImImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示し、

レーン 4 は、 $n = 3$ のもので、TXR-20 ($3 \mu\text{M}$) と ODN-17 ($6 \mu\text{M}$) に化合物 (7a) ($50 \mu\text{M}$) 及び ImImPy ($100 \mu\text{M}$) を添加した場合を示す。

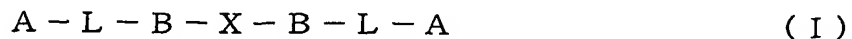
この結果、 $n = 0$ の場合 (レーン 1) には全くクロスリンク体を確認することはできなかったが、 $n = 2$ の場合 (レーン 3) においては先に述べてきた $n = 1$ の場合 (レーン 2) と同様の定量的なインターストランドクロスリンク反応が起こっていることがわかった。しかしながら、 $n = 3$ の場合 (レーン 4) には 20 % 程のクロスリンク体が観察されたにとどまった。

さらに、試薬濃度と等量比の反応条件についても検討を行った結果、最終的に Texas Red-18 ($3 \mu\text{M}$) に対して、化合物 (7a)、ImImPy をそれぞれ $25 \mu\text{M}$ にまで下げた条件まで定量的なクロスリンク反応を確認することができた。

これらの結果、化合物 (7a) と ImImPy などによる協同的インターストランドクロスリンク反応を確立することができた。

さらに最適のトリアミドとクロスリンカーを設計することで、任意の塩基配列を有する DNA サイトにのみ選択的にインターストランドクロスリンクする能力をもつテーラーメイドドラッグを実現することができるようになる。

本発明の一般式 (I)



(式中、各々の B は DNA の塩基配列を認識できる化学構造を示し、各々の A は DNA の塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、L は A 及び B の化学構造を結合させ得るリンカーを示し、X は A-L-B コンポーネントを結合させるスペーサーを示す。)

で表されるDNAの2本鎖をインターストランドクロスリンクすることができる化合物は、2個の(A-L-B)コンポーネントをスペーサーXで相互に連結させた構造を有することを特徴とするものである。

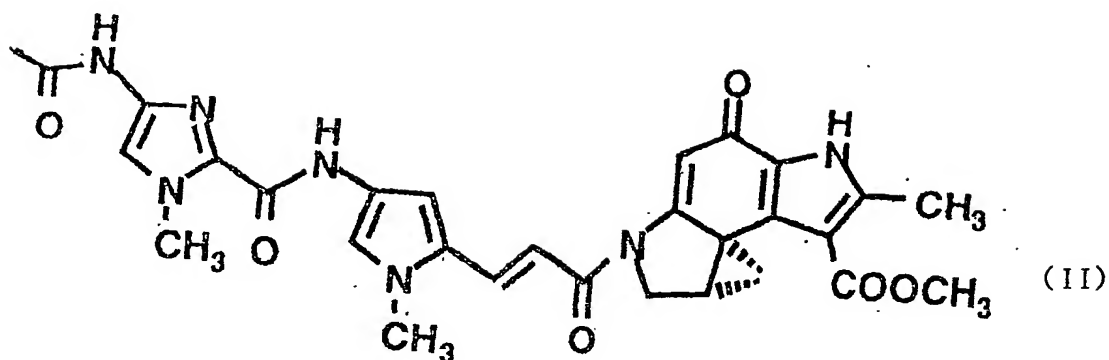
(A-L-B)コンポーネントの中のB部分は、DNAの塩基配列を認識できる化学構造を有するものであり、好ましくは置換基を有してもよいピロール（本明細書ではPyと略称する。）及び／又はイミダゾール（本明細書ではImと略称する。）から誘導される化学構造などであり、これらの置換基を有してもよいピロール環や置換基を有してもよいイミダゾール環をアミド結合で結合させた化学構造が好ましい。この部分の化学構造とこれに結合するDNAの塩基配列については、a) P.B.Dervan, et al., *Nature*, 282, 111-115(1998); b) T.Fujiwara, Z.-F.Tao, Y.Ozeki, I.Saito, A.H.-J.Wang, M.Lee, H.Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 7706-7707(1999).などの公知技術を参照することができる。

(A-L-B)コンポーネントの中のA部分は、DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を有する部分であり、DNA中の塩基と共有結合形成できるものが好ましい。好ましいA部分としてはDNAをアルキル化する抗癌抗生物質のアルキル化部分であって、シクロプロパン環やアジリジン環などを有する化学構造がさらに好ましい。

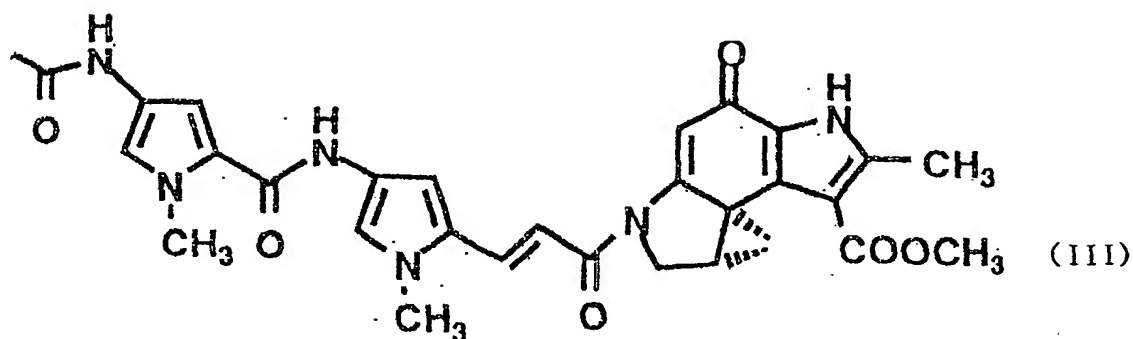
(A-L-B)コンポーネントの中のリンカーLは、A部分及びB部分の化学構造を結合させ得るものであればよく、これによりDNAの塩基をアルキル化する部分とDNAの塩基配列を認識し得る部分とを一体化することが可能となる。即ち、DNAの特定の塩基配列の部分を特異的に認識し、当該認識部位に応じた塩基を特異的にアルキル化して結合することが可能となる。

リンカーLとしては、適当な長さを有し、即ち原子数が2～10個、好ましくは2～5個程度を有し、A部分とB部分を化学結合させ得るものであればよい。好ましいリンカーLとしてはビニル基を含有する化学構造が挙げられる。

好ましい(A-L-B)コンポーネントとしては、次式(II)



又は次式 (III)



で表される基などが挙げられる。

(A-L-B) コンポーネントを結合させるスペーサーXとしては、適当な長さを有し、即ち原子数が1～15個、好ましくは2～8個程度を有し、2個の(A-L-B) コンポーネントを化学結合させ得るものであればよい。例えば、カルボニル基又は炭素数2～15、好ましくは2～8の有機ジカルボン酸から誘導されるアシル基などが挙げられる。有機ジカルボン酸としては飽和又は不飽和の脂肪族ジカルボン酸、飽和又は不飽和の環式脂肪族ジカルボン酸、芳香族時カルボン酸、芳香脂肪族ジカルボン酸、複素環式ジカルボン酸などが挙げられる。

スペーサーXとしては、 $-\text{CO}-$ 基、 $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ 基、 $-\text{CO}-$
 $-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$ 基、又は、 $-\text{CO}-(p-\text{C}_6\text{H}_4)-\text{CO}-$ 基などが挙げ
られるが、脂肪族飽和ジカルボン酸のアシル基が好ましく、より具体的には $-\text{CO}-$
 $-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$ 基などが好ましい。

本発明は、前記した本発明の化合物のいずれかを用いて、2本鎖DNAの特定
の塩基配列部分をインターストランドクロスリンクする方法を提供する。この本
発明の方法においては、さらにDNAの塩基配列を認識できる化学構造を有する
物質、例えばImImPy、ImImImなどのトリアミドの存在下に行うのが
好ましい。

本発明の方法によりインターストランドクロスリンクする場合には、(A-L
-B)コンポーネントの中のB部分のDNAの塩基配列を認識できる化学構造に
より、DNAの特定の塩基配列部分に特異的にインターストランドクロスリンク
することができる。例えば、本発明の化合物として前記した化合物(7a)など
を用いた場合には、DNAのTGGC若しくはGCCA又はそれらの相補鎖部分
にインターストランドクロスリンクすることができる。

また、本発明は、前記した本発明の化合物からなる、2本鎖DNAのインター
ストランドクロスリンク剤を提供する。本発明のインターストランドクロスリン
ク剤は効率よく、しかもDNAの特定の塩基配列部分インターストランドクロス
リンクすることができる。

本発明のインターストランドクロスリンク剤は、DNAの特定の塩基配列の部
分にインターストランドクロスリンクすることができるので、遺伝子の異常によ
る各種の疾患の治療又は予防に有用である。特に癌遺伝子に対してその発現の予
防、治療に有用となる。したがって、本発明は前記した本発明の化合物及び製薬
上許容される担体からなる医薬組成物を提供するものである。本発明の医薬組成
物は、遺伝子の異常に伴う各種疾患、例えば癌の治療又は予防に有用である。

実施例

次に、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施
例に限定されるものではない。

実施例 1 化合物 (7a) の製造

(1) 化合物 (2) の製造

濃硫酸 (1.5 ml, 35.7 mmol) の無水酢酸溶液 (3 ml) 中に 1-メチル-2-ピロールアルデヒド (3.0 g, 27.5 mmol) の無水酢酸溶液 (5 ml) を -40℃ 下で 40 分間ゆっくりと滴下した。反応混合物を -10℃ 下で 2 時間攪拌した後、そこにヘキサン (100 ml) を加えた。生じた沈殿物を桐山ロータを用いて集め、ヘキサン (10 ml x 2) で洗浄することにより黄色粗結晶 (1.43 g, 34%) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

水素化ナトリウム (372 mg, 9.29 mmol, 60% oil suspension) の THF (5 ml) 溶液中に 2-ジエチルホスホノ酢酸エチルエステル (triethylphosphonoacetate) (1.93 ml, 9.75 mmol) を 0℃ 下でゆっくりと加えた。さらに、1-メチル-4-ニトロ-2-ピロールアルデヒド (1.43 g, 9.29 mmol) の THF (10 ml) 溶液を 0℃ 下で加えた後、反応混合物を室温下で 2 時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去し蒸留水 (10 ml) を加えた。水層を酢酸エチル (100 ml x 2) を用いて抽出した。有機層を集め無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、濾過、濃縮し残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25→50% EtOAc in hexane, gradient elution) にて精製することにより化合物 (2) (1.69 g, 81%) を得た。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \quad \delta$

1.34(t, J=7.0Hz, 3H), 3.77(s, 3H), 4.26(q, J=7.0Hz, 2H),
6.31(d, J=16.0Hz, 1H), 7.11(d, J=1.5Hz, 1H),
7.48(d, J=16.0Hz, 1H), 7.56(d, J=1.5Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3) \quad \delta$

14.3, 35.4, 60.8, 106.1, 118.4, 125.3, 129.8, 130.1,
136.7, 166.5.

MS(FAB+) 225[M⁺].

(2) 化合物 (3) の製造

化合物 (2) (500 mg、2.23 mmol) の無水メタノール (25 ml) 溶液中に 10% パラジウム-炭素 (220 mg) を加えた。さらに水素化ホウ素ナトリウム (153 mg、4.04 mmol) の蒸留水 (3 ml) 溶液を 0℃ 下で滴下した後、反応混合物を室温下で 20 分攪拌した。反応溶液をセライトにて濾過した後、酢酸エチル (500 ml) を加えた。有機層を蒸留水 (10 ml) にて洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、濾過、濃縮し褐色粗結晶 (461 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン (10 ml) 溶液中にエチルジイソプロピルアミン (0.52 ml、2.98 mmol) と別途合成した 1-メチル-4-ニトロ-2-トリクロロアセチルイミダゾール ($\text{O}_2\text{NImCOCCl}_3$) (550 mg、2.02 mmol) を、順次 0℃ 下で加えた後、反応混合物を室温下で 1 時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30→50% EtOAc (ヘキサン中)) にて精製することにより、化合物 (3) (400 mg、52% for 2 steps) を得た。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ

1.33(t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 3.71(s, 3H), 4.21(s, 3H),
4.25(q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 6.16(d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H),
6.62(d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 7.32(d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H),
7.55(d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H), 7.82(s, 1H), 8.97(brs, 1H).

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ

14.3, 34.4, 37.1, 60.3, 102.5, 114.2, 117.9, 122.1, 124.4,
127.6, 131.4, 137.2, 145.3, 154.4, 167.4.

MS(FAB+) 347[M+].

(3) 化合物 (4a) の製造

化合物 (3) (250 mg, 0.72 mmol) の無水メタノール-酢酸エチル (1:1, 10 ml) 混合溶液中に 10% パラジウム-炭素 (120 mg) を加えた。さらに水素化ホウ素ナトリウム (54.5 mg, 1.44 mmol) の蒸留水 (0.5 ml) 溶液を 0℃ 下で滴下した後、反応混合物を室温下で 20 分攪拌した。反応溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) にて濾過した後、溶媒を留去して褐色粗結晶 (141 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン (2 ml) 溶液中にエチルジイソプロピルアミン (0.25 ml, 1.33 mmol) とアジポイル-ジクロライド (adipoyl chloride) (32 μ l, 0.22 mmol) を、順次 0℃ で加えた後、反応混合物を室温下で 14 時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0 \rightarrow 3% MeOH in CHCl₃) にて精製することにより化合物 (4a) (96.2 mg, 36% for 2 steps) を得た。

¹H NMR(CDCl₃) δ

1.32(t, J=6.5Hz, 6H), 1.81(s, 4H), 2.42(s, 4H), 3.67(s, 6H),
4.04(s, 6H), 4.24(q, J=6.5Hz, 4H), 6.10(d, J=15.5Hz, 2H),
6.51(s, 2H), 7.34(s, 2H), 7.41(s, 2H), 7.53(d, J=15.5Hz, 2H),
8.04(brs, 2H), 8.80(brs, 2H).

¹³C NMR(5%CD₃OD in CDCl₃) δ

14.1, 24.8, 34.1, 34.5, 34.6, 60.3, 102.3, 112.9, 114.3,
118.0, 122.8, 127.1, 131.8, 133.7, 135.8, 155.8, 168.0, 171.0.

MS(ESI+) 744.6[M⁺].

(4) 化合物 (5a) の製造

4a (76.2 mg, 0.10 mmol) の蒸留水 (0.6 ml) 懸濁液中に 1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデセン-7 (DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) (0.6 ml, 4.01 mmol) を加えた反応溶液を室温下で 15 時間攪拌した。反応の終結を HPLC (0 \rightarrow 100% 50 mm

o 1 ギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル, 20 min, 254 nm) で確認した後、反応溶液の溶媒を留去して得た褐色残留物をジエチルエーテル (10 ml)、酢酸エチル (10 ml) を用いて結晶化させた。得られたDBU塩化合物を1%希塩酸を用いて脱塩した後、生じた沈殿物を桐山ロートを用いて集め減圧下乾燥することにより5a (40.0 mg, 57%) を得た。

¹H NMR(DMSO-d₆) δ

1.58(s, 4H), 2.32(s, 4H), 3.68(s, 6H), 3.94(s, 6H),
6.03(d, J=15.5Hz, 2H), 6.80(s, 2H), 7.41(s, 2H), 7.43(s, 2H),
7.46(d, J=15.5Hz, 2H), 9.89(brs, 2H), 10.24(brs, 2H).

MS(ESI+) 688.5[M+].

(5) 化合物 (6a) の製造

5a (30.0 mg, 43, 6 μmol) の無水ジメチルホルムアミド (1 ml) 溶液中に1, 1'-カルボニルジイミダゾール (1,1'-carbonyldiimidazole) (CDI) (42 mg, 261 μmol) を加えた反応溶液を、室温下で15時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をジエチルエーテル (10 ml) を用いて結晶化を行い化合物 (6a) (35.7 mg, 100%) を得た。

¹H NMR(DMSO-d₆) δ

1.59(s, 4H), 2.34(s, 4H), 3.78(s, 6H), 3.96(s, 6H),
7.11(s, 2H), 7.16(d, J=14.5Hz, 2H), 7.32(s, 2H),
7.45(s, 2H), 7.49(s, 2H), 7.87(d, J=14.5Hz, 2H),
7.90(s, 2H), 8.68(s, 2H), 10.07(brs, 2H), 10.23(brs, 2H).

(6) 化合物 (7a) の製造

水素化ナトリウム (2.6 mg, 64.4 μmol, 60% oil suspension) の無水ジメチルホルムアミド (0.2 ml) 溶液中に、別途合成したDU86の

セグメント A (12.5 mg, 48.3 μ mol) の無水ジメチルホルムアミド (0.2 ml) 溶液を 0℃ 下で加えた後、化合物 (6a) (13.6 mg, 17.2 μ mol) の無水ジメチルホルムアミド (0.2 ml) 溶液を加えた反応溶液を 0℃ 下で 4 時間攪拌した。反応溶液中に 10 mM リン酸ナトリウム (2 ml) 緩衝溶液を 0℃ 下で加えた後、減圧下溶媒を留去し黄色残留物を得た。粗結晶を桐山ロート上で蒸留水 (10 ml)、メタノール (10 ml)、ジエチルエーテル (10 ml) にて順次洗浄し、減圧下乾燥することによって標記の化合物 (7a) (12.2 mg, 61%) を得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

1.29 (m, 2H), 1.58 (s, 4H), 2.09 (m, 2H), 2.33 (s, 4H),
2.47 (s, 6H), 3.45 (m, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.73 (s, 6H),
3.95 (s, 6H), 4.18 (m, 2H), 4.28 (m, 2H),
6.57 (d, $J=14.5\text{Hz}$, 2H), 6.83 (brs, 2H), 6.99 (s, 2H),
7.41 (s, 2H), 7.44 (s, 2H), 7.58 (d, $J=14.5\text{Hz}$, 2H),
9.98 (s, 2H), 10.23 (s, 2H), 12.36 (brs, 2H).

MS (ESI+) 1168.6 [M^+].

実施例 2 化合物 (7b) の製造

(1) 化合物 (4b) の製造

実施例 1 の (2) で製造した化合物 (3) (420 mg, 1.21 mmol) の無水メタノール-酢酸エチル (1:1, 30 ml) 混合溶液中に 10% パラジウム-炭素 (200 mg) を加えた。さらに水素化ホウ素ナトリウム (106 mg, 2.80 mmol) の蒸留水 (1 ml) 溶液を 0℃ 下で滴下した後、反応混合物を室温下で 20 分攪拌した。反応溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) にて濾過した後、溶媒を留去して褐色粗結晶 (327 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン (10 ml) 溶液中にエチルジイソプロピルアミン (0.6 ml, 3.63 mmol) とテレフタル酸ジクロライド (terephthaloyl

chloride) (122 mg, 0.61 mmol) を、順次 0℃ 下で加えた後、反応混合物を室温下で 2 時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0 → 3% MeOH in CHCl₃) にて精製することにより化合物 (4b) (223 mg, 48% for 2 steps) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ

1.33 (t, J=7.5Hz, 6H), 3.71 (s, 6H), 4.12 (s, 6H),
4.25 (q, J=7.5Hz, 4H), 6.13 (d, J=16.0Hz, 2H),
6.55 (s, 2H), 7.38 (s, 2H), 7.56 (d, J=16.0Hz, 2H),
7.61 (s, 2H), 8.02 (s, 4H), 8.38 (brs, 2H), 8.82 (brs, 2H).

(2) 化合物 (5b) の製造

化合物 (4b) (30.0 mg, 0.04 mmol) の蒸留水 (0.2 ml) 懸濁液中に 1, 8-ジアザビシクロ [5, 4, 0] ウンデセン-7 (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) (DBU) (0.2 ml, 1.34 mmol) を加えた反応溶液を室温下で 12 時間攪拌した。反応の終結を HPLC (0 → 100% 50 mmol, ギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル, 20 min, 254 nm) で確認した後、反応溶液の溶媒を留去して得た褐色残留物をジエチルエーテル (10 ml)、酢酸エチル (10 ml) を用いて結晶化させた。得られた DBU 塩化合物を 1% 希塩酸を用いて脱塩した後、生じた沈殿物を桐山ロートを用いて集め減圧下乾燥することにより化合物 (5b) (21.5 mg, 85%) を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

3.68 (s, 6H), 4.00 (s, 6H), 6.04 (d, J=16.0Hz, 2H), 6.81 (s, 2H),
7.43 (s, 2H), 7.46 (d, J=16.0Hz, 2H), 7.66 (s, 2H), 8.10 (s, 4H),
9.95 (s, 2H), 10.95 (s, 2H).

(3) 化合物 (6b) の製造

化合物 (5 b) (54.5 mg、79.9 μ mol) の無水ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液中に、CDI (76 mg、231 μ mol) を加えた反応溶液を室温下で15時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をジエチルエーテル (10 ml) を用いて結晶化を行い化合物 (6 b) (63.0 mg、97%) を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

3.79(s, 6H), 4.02(s, 6H), 7.10(s, 2H), 7.17(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H),
7.32(s, 2H), 7.50(s, 2H), 7.68(s, 2H), 7.87(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H),
7.90(s, 2H), 8.11(s, 4H), 8.67(s, 2H), 10.15(s, 2H),
10.96(s, 2H).

(4) 化合物 (7 b) の製造

水素化ナトリウム (4.5 mg、112.5 μ mol、60% oil suspension) の無水ジメチルホルムアミド (0.1 ml) 溶液中に、別途合成したDU86のセグメントA (21.0 mg、81.3 μ mol) の無水ジメチルホルムアミド (0.1 ml) 溶液を0℃下で加えた後、化合物 (6 b) (21.0 mg、24.9 μ mol) の無水ジメチルホルムアミド (0.8 ml) 溶液を加えた反応溶液を0℃下で18時間攪拌した。反応溶液中に10 mMリン酸ナトリウム (2 ml) 緩衝溶液を0℃下で加えた後、減圧下溶媒を留去し黄色残留物を得た。粗結晶を桐山ロート上で蒸留水 (10 ml)、メタノール (10 ml)、ジエチルエーテル (10 ml) にて順次洗浄し、減圧下乾燥することによって標記の化合物 (7 b) (24.5 mg、83%) を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

1.30(m, 2H), 2.09(m, 2H), 2.47(s, 6H), 3.46(m, 2H),
3.74(s, 12H), 4.02(s, 6H), 4.20(m, 2H), 4.29(m, 2H),
6.60(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H), 6.83(brs, 2H), 7.01(s, 2H),
7.43(s, 2H), 7.58(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H), 7.68(s, 2H),
8.12(s, 4H), 10.05(s, 2H), 10.96(s, 2H), 12.36(brs, 2H).

MS (ESI+) 1188.9 [M⁺].

実施例 3 化合物 (7c) の製造

(1) 化合物 (4c) の製造

実施例 1 の (2) で製造した化合物 (3) (200 mg、0.58 mmol) の無水メタノール-酢酸エチル (1 : 1、20 ml) 混合溶液中に 10 % パラジウム-炭素 (100 mg) を加えた。さらに水素化ホウ素ナトリウム (44 mg、1.15 mmol) の蒸留水 (0.5 ml) 溶液を 0℃ 下で滴下した後、反応混合物を室温下で 20 分攪拌した。反応溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) にて濾過した後、溶媒を留去して褐色粗結晶 (93 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン (2 ml) 溶液中にエチルジイソプロピルアミン (0.15 ml、0.88 mmol) とフマル酸ジクロライド (fumaryl chloride) (16 μ l、0.15 mmol) を順次 0℃ 下で加えた後、反応混合物を室温下で 12 時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0 \rightarrow 3 % MeOH in CHCl₃) にて精製することにより化合物 (4c) (50.1 mg、41 % for 2 steps) を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

1.25 (t, J=7.0 Hz, 6H), 3.70 (s, 6H), 3.98 (s, 6H),
4.16 (q, J=7.0 Hz, 4H), 6.11 (d, J=16.0 Hz, 2H), 6.85 (s, 2H),
7.26 (s, 2H), 7.45 (s, 2H), 7.52 (d, J=16.0 Hz, 2H),
7.61 (s, 2H), 9.97 (s, 2H), 10.90 (s, 2H).

(2) 化合物 (5c) の製造

化合物 (4c) (40.1 mg、0.06 mmol) の蒸留水 (0.3 ml) 懸濁液中に DBU (0.3 ml、2.00 mmol) を加えた反応溶液を室温下で 17 時間攪拌した。反応の終結を HPLC (0 \rightarrow 100 % 50 mmol 辛酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル, 20 min, 254 nm) で確認した後、

反応溶液の溶媒を留去して得た褐色残留物をジエチルエーテル (10 ml)、酢酸エチル (10 ml) を用いて結晶化させた。得られたDBU塩化合物を1%希塩酸を用いて脱塩した後、生じた沈殿物を桐山ロートを用いて集め減圧下乾燥することにより化合物 (5c) (22.5 mg、61%) を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

3.69(s, 6H), 3.98(s, 6H), 6.04(d, $J=16.0\text{Hz}$, 2H),
6.83(s, 2H), 7.26(s, 2H), 7.43(s, 2H), 7.47(d, $J=16.0\text{Hz}$, 2H),
7.60(s, 2H), 9.97(s, 2H), 10.90(s, 2H).

(3) 化合物 (6c) の製造

化合物 (5c) (17.5 mg、26.5 μmol) の無水ジメチルホルムアミド (1 ml) 溶液中にCDI (30 mg、185 μmol) を加えた反応溶液を室温下で15時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をジエチルエーテル (10 ml) を用いて結晶化を行い化合物 (6c) (18.5 mg、92%) を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

3.78(s, 6H), 4.00(s, 6H), 7.11(s, 2H),
7.17(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H), 7.28(s, 2H), 7.34(s, 2H),
7.52(s, 2H), 7.63(s, 2H), 7.89(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H),
7.91(s, 2H), 8.68(s, 2H), 10.17(s, 2H), 10.89(s, 2H).

(4) 化合物 (7c) の製造

水素化ナトリウム (2.8 mg、71.2 μmol 、60% oil suspension) の無水ジメチルホルムアミド (0.1 ml) 溶液中に、別途合成したDU86のセグメントA (13.8 mg、53.4 μmol) の無水ジメチルホルムアミド (0.1 ml) 溶液を0℃下で加えた後、化合物 (6c) (13.5 mg、17.8 μmol) の無水ジメチルホルムアミド (0.7 ml) 溶液を加えた反応溶液を0℃下で12時間攪拌した。反応溶液中に10 mMリン酸ナトリウム (2 m

1) 緩衝溶液を0℃下で加えた後、減圧下溶媒を留去し黄色残留物を得た。粗結晶を桐山ロート上で蒸留水(10 ml)、メタノール(10 ml)、ジエチルエーテル(10 ml)にて順次洗浄し、減圧下乾燥することによって標記の化合物(7c)(9.6 mg, 47%)を得た。

¹H NMR(DMSO-d₆) δ

1.30(m, 2H), 2.08(m, 2H), 2.47(s, 6H), 3.47(m, 2H),
3.73(s, 6H), 3.74(s, 6H), 3.99(s, 6H), 4.20(m, 2H),
4.29(m, 2H), 6.59(d, J=15.0Hz, 2H), 6.79(brs, 2H),
7.01(s, 2H), 7.28(s, 2H), 7.43(s, 2H),
7.58(d, J=15.0Hz, 2H), 7.61(s, 2H), 10.07(s, 2H),
10.89(s, 2H), 12.36(brs, 2H).

MS(ESI+) 1138.5[M⁺].

実施例4 化合物(7d)の製造

(1) 化合物(4d)の製造

実施例1の(2)で製造した化合物(3)(200 mg, 0.58 mmol)の無水メタノール-酢酸エチル(1:1, 20 ml)混合溶液中に10%パラジウム-炭素(100 mg)を加えた。さらに水素化ホウ素ナトリウム(44 mg, 1.15 mmol)の蒸留水(0.5 ml)溶液を0℃下で滴下した後、反応混合物を室温下で20分攪拌した。反応溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc)にて濾過した後、溶媒を留去して褐色粗結晶(63 mg)を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン(2 ml)溶液中にCDI(16 mg, 0.10 mmol)を0℃下で加えた後、反応混合物を室温下で12時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0→3% MeOH in CHCl₃)にて精製することにより化合物(4d)(51.3 mg, 45% for 2 steps)を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

1.24(t, $J=7.0\text{Hz}$, 6H), 3.70(s, 6H), 3.96(s, 6H),
4.15(q, $J=7.0\text{Hz}$, 4H), 6.08(d, $J=16.0\text{Hz}$, 2H), 6.87(s, 2H),
7.26(s, 2H), 7.45(s, 2H), 7.51(d, $J=16.0\text{Hz}$, 2H),
8.31(brs, 2H), 10.10(s, 2H).

(2) 化合物(5d)の製造

4d(41.3mg、0.06mmol)の蒸留水(0.3ml)懸濁液中にDBU(0.3ml、2.00mmol)を加えた反応溶液を室温下で17時間攪拌した。反応の終結をHPLC(0→100% 50mmolギ酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル, 20min, 254nm)で確認した後、反応溶液の溶媒を留去して得た褐色残留物をジエチルエーテル(10ml)、酢酸エチル(10ml)を用いて結晶化させた。得られたDBU塩化合物を1%希塩酸を用いて脱塩した後、生じた沈殿物を桐山ロートを用いて集め減圧下乾燥することにより化合物(5d)(27.4mg、73%)を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

3.68(s, 6H), 3.96(s, 6H), 6.01(d, $J=16.0\text{Hz}$, 2H),
6.84(s, 2H), 7.26(s, 2H), 7.42(s, 2H), 7.47(d, $J=16.0\text{Hz}$, 2H),
8.84(brs, 2H), 10.08(s, 2H).

(3) 化合物(6d)の製造

化合物(5d)(22.4mg、37.1 μmol)の無水ジメチルホルムアミド(1ml)溶液中にCDI(30mg、185 μmol)を加えた反応溶液を室温下で15時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をジエチルエーテル(10ml)を用いて結晶化を行い化合物(6d)(25.2mg、96%)を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

3.79(s, 6H), 3.98(s, 6H), 7.10(s, 2H),
7.15(d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H), 7.28(s, 2H), 7.34(s, 2H),

7.50(s, 2H), 7.87(d, J=15.0Hz, 2H), 7.90(s, 2H),
8.67(s, 2H), 8.89(brs, 2H), 10.25(s, 2H).

(4) 化合物(7d)の製造

水素化ナトリウム(4.6mg、114.4 μ mol、60% oil suspension)の無水ジメチルホルムアミド(0.1ml)溶液中に、別途合成したDU86のセグメントA(22.1mg、85.8 μ mol)の無水ジメチルホルムアミド(0.1ml)溶液を0℃下で加えた後、化合物(6d)(20.2mg、28.6 μ mol)の無水ジメチルホルムアミド(0.1ml)溶液を加えた反応溶液を0℃下で12時間攪拌した。反応溶液中に10mMリン酸ナトリウム(2ml)緩衝溶液を0℃下で加えた後、減圧下溶媒を留去し黄色残留物を得た。粗結晶を桐山ロート上で蒸留水(10ml)、メタノール(10ml)、ジエチルエーテル(10ml)にて順次洗浄し、減圧下乾燥することによって標記の化合物(7d)(5.5mg、18%)を得た。

¹H NMR(DMSO-d₆) δ

1.29(m, 2H), 2.09(m, 2H), 2.47(s, 6H), 3.44(m, 2H),
3.72(s, 6H), 3.73(s, 6H), 3.97(s, 6H), 4.18(m, 2H),
4.27(m, 2H), 6.56(d, J=14.5Hz, 2H), 6.84(brs, 2H),
7.01(s, 2H), 7.26(s, 2H), 7.42(s, 2H),
7.57(d, J=14.5Hz, 2H), 8.82(brs, 2H), 10.16(s, 2H),
12.35(brs, 2H).

MS(ESI+) 1084.5[M⁺].

実施例5 ImImPy(化合物(11))の製造

(1) O₂NPyLCONHCH₂CH₂CH₂NMe₂(化合物(8))の製造

O₂NPyCOCCl₃(500mg、1.84mmol)にジメチルアミノプロピルアミン(1ml、8.33mmol)を加えた後、反応混合物を室温下で12時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た黄色残留物をジエチルエーテ

ル (3 ml) を用いて結晶化を行い化合物 (8) (460 mg, 97%) を得た。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) \quad \delta$

1.75(t, $J=6.0\text{Hz}$, 2H), 2.34(s, 6H), 2.54(t, $J=6.0\text{Hz}$, 2H),
3.49(q, $J=6.0\text{Hz}$, 2H), 4.00(s, 3H), 6.94(s, 1H),
7.52(s, 1H), 8.68(brs, 1H).

(2) $\text{O}_2\text{NImPyLCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$ (化合物 (9)) の製造

化合物 (8) (460 mg, 1.81 mmol) の無水メタノール (3 ml) 溶液中に 10% パラジウム-炭素 (120 mg) を加えた後、反応混合物を水素圧下、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液をセライト (MeOH) にて濾過した後、溶媒を留去して黄色粗結晶 (413 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン (8 ml) 溶液中に、エチルジイソプロピルアミン (0.5 ml, 2.87 mmol) と、別途合成した $\text{O}_2\text{NImCOCCl}_3$ (493 mg, 1.81 mmol) を順次 0℃ 下で加えた後、反応混合物を室温下で 15 時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た残留物中に、蒸留水 (30 ml) を加えて生じる黄色沈殿物を桐山ロートに用いて濾取した。蒸留水 (30 ml)、ジエチルエーテル (5 ml) にて順次洗浄し、減圧下乾燥することによって化合物 (9) (587 mg, 86% for 2 steps) を得た。

$^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6) \quad \delta$

1.61(t, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 2.14(s, 6H), 2.24(t, $J=7.0\text{Hz}$, 2H),
3.19(q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 3.81(s, 3H), 4.04(s, 3H), 6.97(s, 1H),
7.27(s, 1H), 8.14(brs, 1H), 8.61(s, 1H), 10.80(brs, 1H).

(3) $\text{O}_2\text{NImImPyLCONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$ (化合物 (10)) の製造

化合物 (9) (100 mg, 0.27 mmol) の無水メタノール (3 ml) 溶液中に 10% パラジウム-炭素 (50 mg) を加えた後、反応混合物を水素圧

下、室温で4時間攪拌した。反応溶液をセライト (MeOH) にて濾過した後、溶媒を留去して黄色粗結晶 (65.3 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶の無水塩化メチレン (2 ml) 溶液中に、エチルジイソプロピルアミン (0.1 ml, 0.57 mmol) と、別途合成した $O_2NImCOCCl_3$ (72.2 mg, 0.27 mmol) を順次 0℃ 下で加えた後、反応混合物を室温下で15時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た残留物中に、蒸留水 (10 ml) を加えて生じる黄色沈殿物を桐山ロートを用いて濾取した。蒸留水 (10 ml)、ジエチルエーテル (2 ml) にて順次洗浄し、減圧下乾燥することによって化合物 (10) (58.2 mg, 44% for 2 steps) を得た。

1H NMR(DMSO- d_6) δ

1.61(t, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.15(s, 6H), 2.25(t, $J=7.0$ Hz, 2H),
3.19(q, $J=7.0$ Hz, 2H), 3.80(s, 3H), 4.04(s, 3H),
4.06(s, 3H), 6.91(s, 1H), 7.23(s, 1H), 7.58(s, 1H),
8.13(brs, 1H), 8.65(s, 1H), 10.29(s, 1H).

(4) AcHNImImPyLCONHCH₂CH₂CH₂NMe₂ (化合物 (11)) の製造

化合物 (10) (48.2 mg, 96.4 μ mol) の無水メタノール-酢酸エチル (2:1, 6 ml) 混合溶液中に10%パラジウム-炭素 (40 mg) を加えた後、水素化ホウ素ナトリウム (8 mg, 0.21 mmol) の蒸留水 (0.4 ml) 溶液を 0℃ 下で滴下し、反応混合物を室温下で20分攪拌した。反応溶液をセライト (MeOH) にて濾過した後、溶媒を留去して黄色粗結晶 (38 mg) を得た。さらなる精製に付することなく直ちにこのものを次の反応に用いた。

粗結晶にエチルジイソプロピルアミン (0.1 ml, 0.57 mmol) と無水酢酸 (0.1 ml, 1.05 mmol) を加えた後、反応混合物を室温下で4時間攪拌した。反応溶液の溶媒を留去して得た残留物中に、クロロホルム (1 ml) を加えて生じる不溶物を濾過により除いた。溶媒を留去して得た粗結晶にジエチルエーテル (2 ml) を加えて洗浄し、減圧下乾燥することによって標記の

化合物 (11) (23.2 mg, 47% for 2 steps) を得た。

^1H NMR(DMSO- d_6) δ

1.61(m, 2H), 2.04(s, 3H), 2.14(s, 6H), 2.25(m, 2H),
3.19(m, 2H), 3.81(s, 3H), 3.98(s, 3H), 4.00(s, 3H),
6.92(s, 1H), 7.23(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.56(s, 1H),
8.12(brs, 1H), 9.34(s, 1H), 10.27(s, 1H), 10.30(s, 1H).

実施例 6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析

全量 $10\ \mu\text{l}$ のカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 5 mM 中に 5' 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント $3\ \mu\text{M}$ とその相補的 DNA オリゴマー $6\ \mu\text{M}$ 、DMF 20% (v/v) と先に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて 37°C 下で一晩静置した。Milli-Q 精製した蒸留水 $110\ \mu\text{l}$ を加えて希釈した後、そこから $1\ \mu\text{l}$ を取り出した。その溶液 ($1\ \mu\text{l}$) から遠心減圧下得られた DNA をローディング色素 (フューシンレッドの DMF 溶液) $8\ \mu\text{l}$ に溶解させた。その $2\ \mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNA sequencer system を用いた 15% ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。

実施例 7 インターストランドクロスリンク体の構造確認試験

全量 $10\ \mu\text{l}$ のカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 5 mM 中に 5' 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント $3\ \mu\text{M}$ とその相補的 DNA オリゴマー $6\ \mu\text{M}$ 、DMF 20% (v/v) と先に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて 37°C 下で一晩静置した。

反応溶液より $1\ \mu\text{l}$ 取り出し、そこに Milli-Q を $11\ \mu\text{l}$ 加えて希釈した。その希釈溶液から $1\ \mu\text{l}$ 取り出しレーン 2、レーン 7 に用いた。希釈溶液 ($11\ \mu\text{l}$) を 90°C で 20 分間振動した後、ピペリジン ($1\ \mu\text{l}$) を加えさらに 90°C で 20 分間振動した。その溶液を遠心減圧後、さらに一晩凍結乾燥を行った。そこに 50 mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) $1\ \mu\text{l}$ と Milli-Q を $10\ \mu\text{l}$ 加えて希釈した。その希釈溶液から $1\ \mu\text{l}$ 取り出しレーン 3、レーン 8 に

用いた。溶液 ($10\ \mu\text{l}$) 中に Ap ($1\ \mu\text{l}$) を加え 37°C で 2 時間振動した後、 $1\ \mu\text{l}$ 取り出しレーン 4、レーン 9 に用いた。

それぞれ取り出した反応溶液から遠心減圧下得られた DNA をローディング色素 (フューシンレッドの DMF 溶液) $8\ \mu\text{l}$ に溶解させ、その $2\ \mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNA sequencer system を用いた 15 % ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。

実施例 8 インターストランドクロスリンク体の塩基配列特異性試験

全量 $10\ \mu\text{l}$ のカコジル酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) $5\ \text{mM}$ 中に 5' 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント $3\ \mu\text{M}$ と各種 DNA オリゴマー $6\ \mu\text{M}$ 、DMF 20 % (v/v) と先に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて 37°C 下で一晩静置した。Milli-Q 精製した蒸留水 $110\ \mu\text{l}$ を加えて希釈した後、そこから $1\ \mu\text{l}$ を取り出した。その溶液 ($1\ \mu\text{l}$) から遠心減圧下得られた DNA をローディング色素 (フューシンレッドの DMF 溶液) $8\ \mu\text{l}$ に溶解させた。その $2\ \mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNA sequencer system を用いた 15 % ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。

実施例 9 インターストランドクロスリンク反応の最適条件試験

全量 $10\ \mu\text{l}$ のカコジル酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) $5\ \text{mM}$ 中に各種の 5' 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント $3\ \mu\text{M}$ とそれぞれに対応した相補的 DNA オリゴマー $6\ \mu\text{M}$ 、DMF 20 % (v/v) と先に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて 37°C 下で一晩静置した。Milli-Q 精製した蒸留水 $110\ \mu\text{l}$ を加えて希釈した後、そこから $1\ \mu\text{l}$ を取り出した。その溶液 ($1\ \mu\text{l}$) から遠心減圧下得られた DNA をローディング色素 (フューシンレッドの DMF 溶液) $8\ \mu\text{l}$ に溶解させた。その $2\ \mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNA sequencer system を用いた 15 % ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。

実施例 10 試薬濃度と等量比の反応条件試験

全量 $10\ \mu\text{l}$ のカコジル酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) $5\ \text{mM}$ 中に $5'$ 末端がテキサスレッドでラベルされた DNA フラグメント (TXR-18) $3\ \mu\text{M}$ と相補的 DNA オリゴマー (ODN-15) $6\ \mu\text{M}$ 、DMF 20% (v/v) と表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて 37°C 下で一晩静置した。

[7a (μM)、ImImPy (μM) ; 50、100 (レーン1) ; 25、50 (レーン2) ; 12、25 (レーン3) ; 6、12 (レーン4) ; 3、6 (レーン5) ; 25、100 (レーン6) ; 25、50 (レーン7) ; 25、25 (レーン8) ; 25、12 (レーン9)、25、6 (レーン10)]

Milli-Q 精製した蒸留水 $110\ \mu\text{l}$ を加えて希釈した後、そこから $1\ \mu\text{l}$ を取り出した。その溶液 ($1\ \mu\text{l}$) から遠心減圧下得られた DNA をローディング色素 (フューシンレッドの DMF 溶液) $8\ \mu\text{l}$ に溶解させた。その $2\ \mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNA sequencer system を用いた 15% ディネーチャーポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。

結果を第 6 図に示す。第 6 図の各レーンにおける 7a (μM) と ImImPy (μM) の濃度は前記したとおりである。

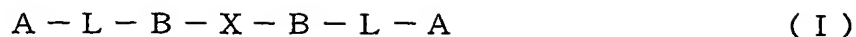
また、クロスリンク収率を第 7 図に示す。第 7 図の左側は、ImImPy と 7a が 2 : 1 の場合の試料の等量を示し、第 7 図の右側は 7a が $25\ \mu\text{M}$ の場合の ImImPy の等量を示している。

産業上の利用可能性

本発明は、DNA 上に存在する特定の塩基配列に対して選択的にインターストランドクロスリンクすることを可能とする試薬である。このことはヒトゲノム上での重要な遺伝子配列、あるいは遺伝子異常に対する有用なドラッグとして、はじめての遺伝子レベルでの創薬を実現する可能性を秘めている。

請 求 の 範 囲

1. 一般式 (I)



(式中、各々のBはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、各々のAはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示し、XはA-L-Bコンポーネントを結合させるスペーサーを示す。)

で表されるDNAの2本鎖をインターストランドクロスリンクすることができる化合物。

2. DNAの塩基配列を認識できる化学構造が、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造である請求の範囲第1項に記載の化合物。

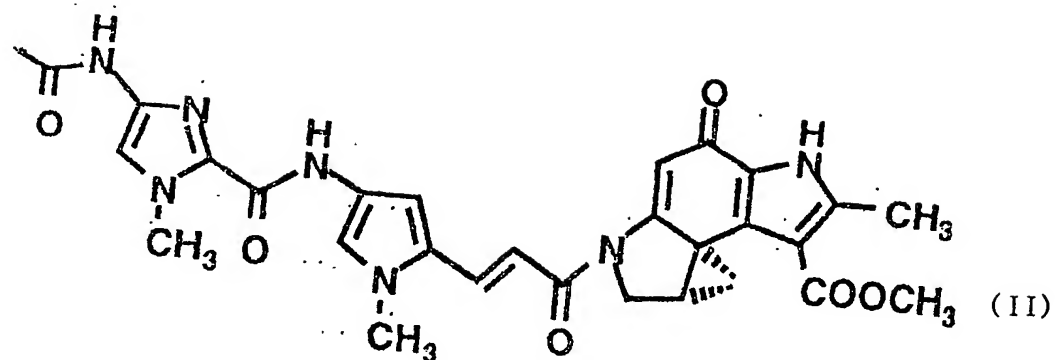
3. DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造が、シクロプロパン環を有する化学構造である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化合物。

4. A及びBの化学構造を結合させ得るリンカーLが、ビニル基を含有する化学構造である請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の化合物。

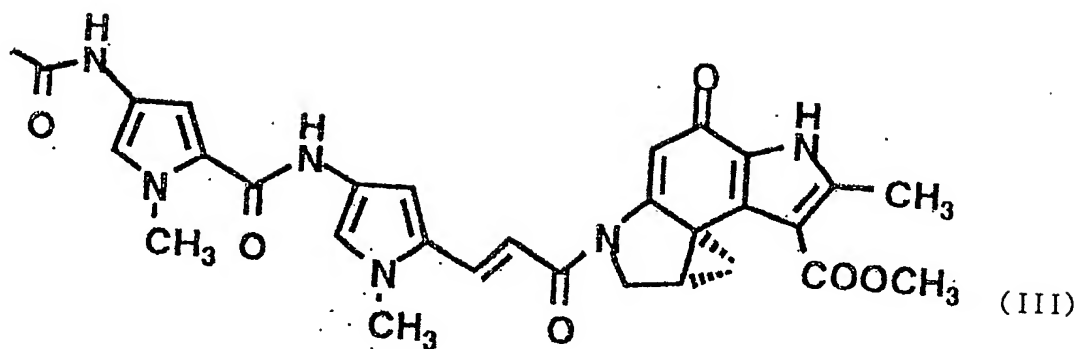
5. A-L-Bコンポーネントを結合させるスペーサーXが、カルボニル基又は有機ジカルボン酸から誘導されるアシル基である請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の化合物。

6. 有機ジカルボン酸が、脂肪族飽和若しくは不飽和ジカルボン酸又は芳香族ジカルボン酸である請求の範囲第5項に記載の化合物。

7. 一般式(I)で表される化合物のA-L-Bコンポーネントが次式(II)

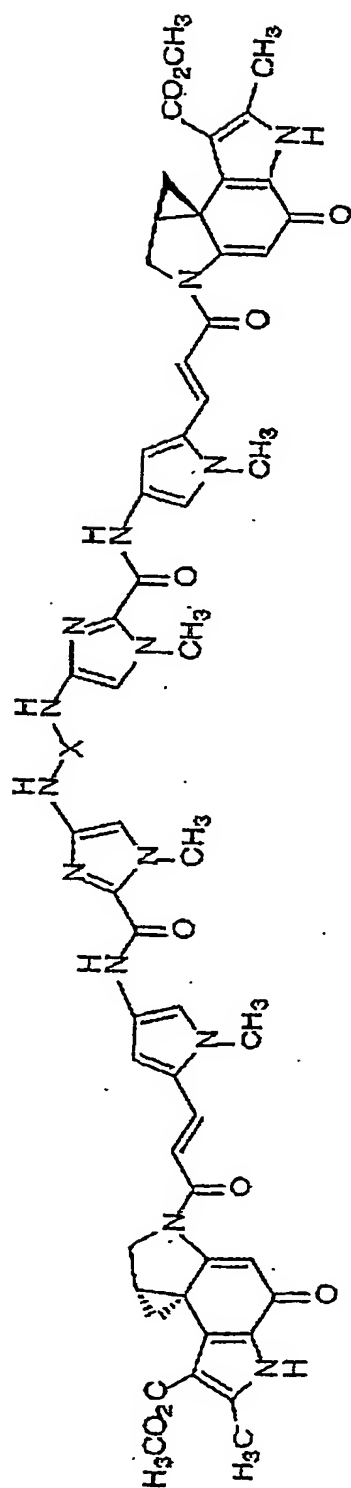


又は次式 (III)



で表される化合物である請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記載の化合物。

8. 一般式 (I) で表される化合物が、次式 (IV)



(IV)

(式中、Xは、 $-\text{CO}-$ 基、 $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ 基、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$ 基、又は、 $-\text{CO}-(p-\text{C}_6\text{H}_4)-\text{CO}-$ 基で表される基を示す。)で表される化合物である請求の範囲第7項に記載の化合物。

9. 請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の化合物を用いて、2本鎖DNAの特定の塩基配列部分をインターストランドクロスリンクする方法。

10. 2本鎖DNAのインターストランドクロスリンクを、さらにDNAの塩基配列を認識できる化学構造を有する物質の存在下に行う請求の範囲第9項に記載の方法。

11. DNAの塩基配列を認識できる化学構造を有する物質が、 ImImPy で表される物質である請求の範囲第10項に記載の方法。

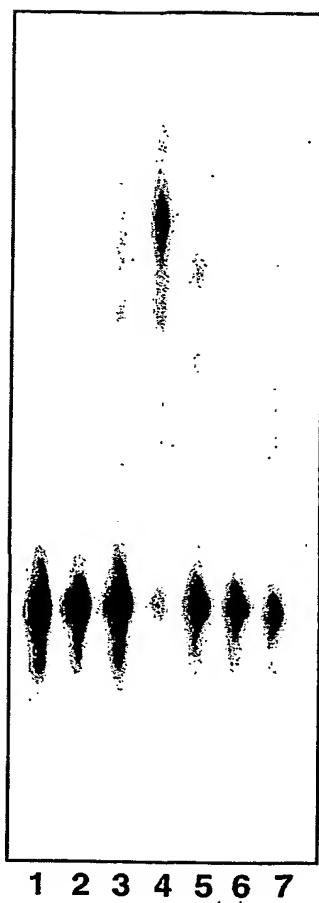
12. 特定の塩基配列が、 TGGC 若しくは GCCA 又はそれらの相補鎖である請求の範囲第9項～第11項のいずれか1項に記載の方法。

13. 請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の化合物からなる、2本鎖DNAのインターストランドクロスリンク剤。

14. 請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の化合物及び製薬上許容される担体を含有してなる医薬組成物。

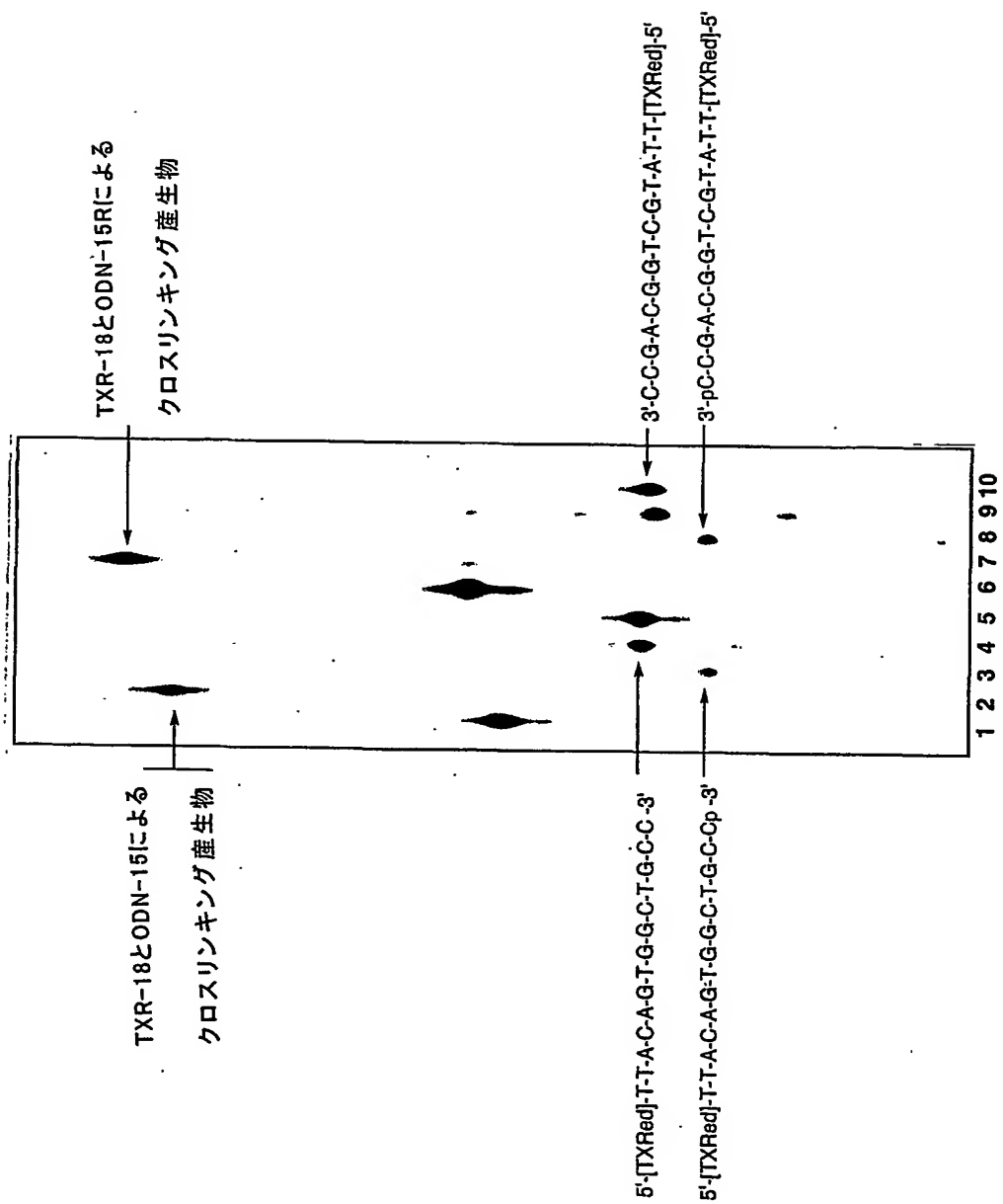
15. 癌の治療薬である請求の範囲第14項に記載の医薬組成物。

第 1 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

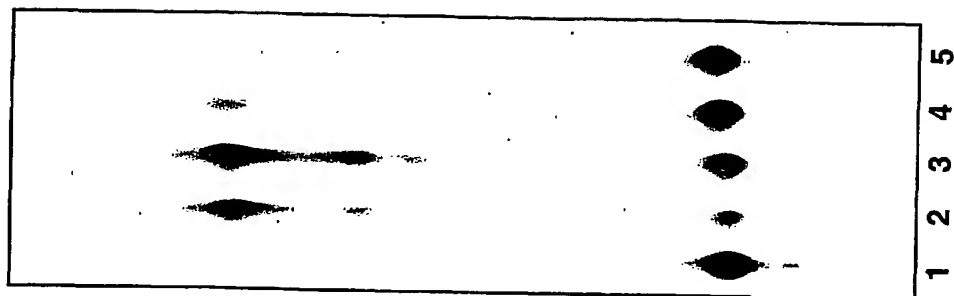
第 2 図



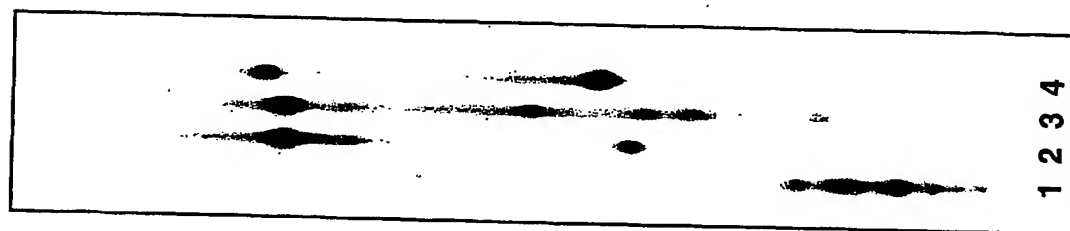
THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

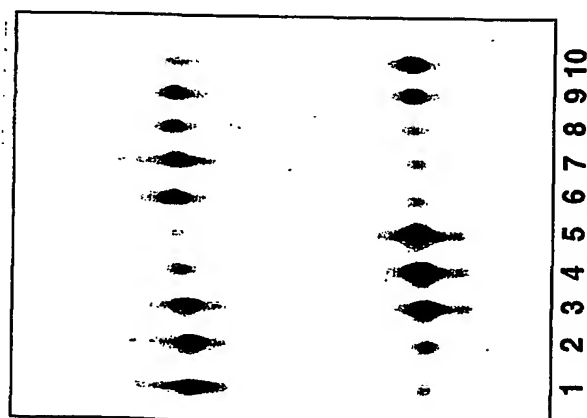
第 4 図



第 5 図

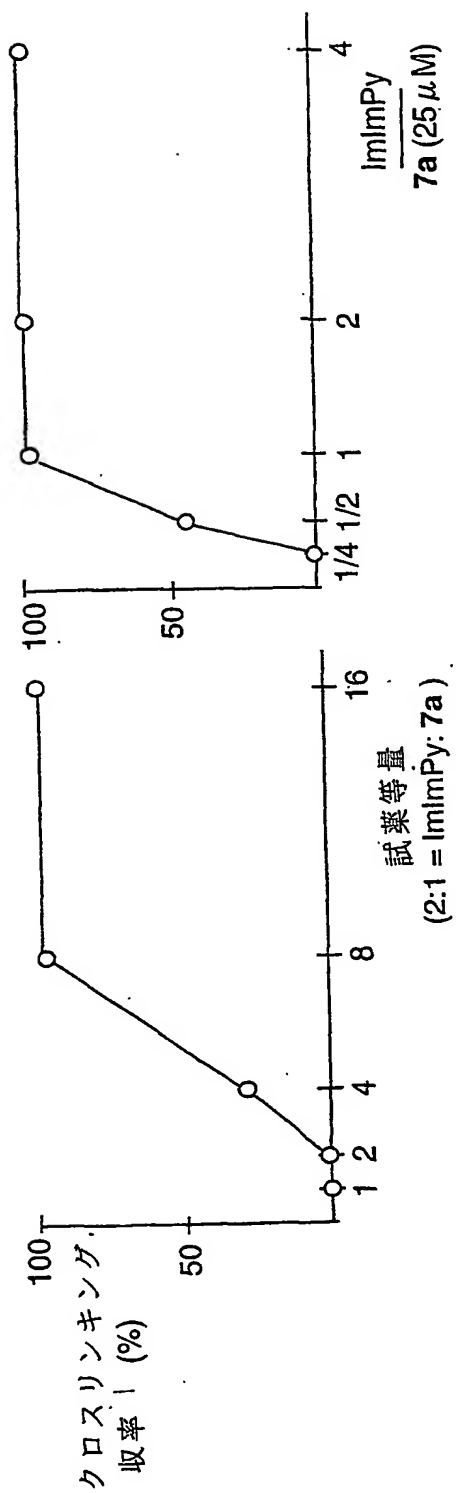


第 6 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 7 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Method of Synthesis for interstrand-crosslinking agents.

<130> JA906778

<150> JP 2000-140361

<151> 2000-05-12

<160> 9

<210> 1

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

cgacg 5

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 2

ttacagtggc tgccagca 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ttatgctggc agccactg 18

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ttacagtggc tgcc 14

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ttacagtggc gccagca 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ttacagtggc tgccagca 18

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ttacagtggc ttgccagca 19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttacagtggc ttgccagca 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 9

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ttacagtggc tgcc

14

<210> 10

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

tggttgcca

9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07D487/04, A61K31/4178, A61P35/00, C12N15/09 // C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D487/04, A61K31/4178, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97/44000 A2 (Panorama Research, Inc.), 27 November, 1997 (27.11.97), & US 5843937 A & JP 2000-511893 A & EP 918752 A2	1-15
A	WO 96/23497 A1 (Synphar Laboratories, Inc.), 08 August, 1996 (08.08.96), & US 5502068 A & EP 800390 A1 & JP 11-500427 A	1-15
PA	EP 1083177 A1 (Japan Science and Technology Corporation), 04 March, 2001 (04.03.01), & WO 00/58312 A1 & JP 2000-281679 A	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Y"

document member of the same patent family

"&"

Date of the actual completion of the international search
30 July, 2001 (30.07.01)Date of mailing of the international search report
07 August, 2001 (07.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

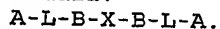
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03756

The invention as set forth in claim 1 relates to compounds represented by the following general formula:



Concerning the structure thereof, definitions are made depending on the desired characteristics such as "B represents a chemical structure capable of recognizing a base sequence of a DNA" or "A represents a chemical structure capable of binding to one of the bases of the DNA".

Also, the linker L and the spacer X are merely specified respectively by the characteristics of "L represents a linker by which the chemical structures A and B can be linked to each other" and "X represents a spacer by which the A-L-B components can be linked to each other".

Moreover, the compounds perse are specified by the desired characteristic of "by which two DNA strands can be interstrand-crosslinked".

Although claim 1 involves any compounds having the above-described characteristics in its scope, it is recognized that only a small part of the claimed compounds have been supported in the description in the meaning under the provision of Article 6 of the PCT or disclosed therein in the meaning under the provision of Article 5 of the PCT.

Even by considering the common technical knowledge at the point of the application, the scope of compounds having the above-described characteristics could not be definitely specified. Therefore, claim 1 fails to satisfy the requirement of clearness under the provision of Article 6 of the PCT too.

Such being the case, the international search has been practiced exclusively on the compound particularly stated in the description, i.e., the compound cited as "compound 7a" in page 7 of the description the production process of which and the characteristics of which as an "interstrand crosslinking agent" had been confirmed.

In the case of the compound cited as "compound 7b-d" in page 7 of the description, it can be hardly recognized as a compound "by which two DNA strands can be interstrand-crosslinked" on the basis of the statement from line 8 in page 7 to line 8 in page 8 of the description and the illustration of Fig. 1. However, the production process thereof is particularly disclosed in Examples. Thus, this international search has been also practiced on this compound 7b-d.

The same applies to claims 2 to 7 and 9 to 15.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D487/04, A61K31/4178, A61P35/00, C12N15/09
//C07H21/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07D487/04, A61K31/4178, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 97/44000 A2 (PANORAMA RESEARCH, INC.) 27.11月.1997 (27.11.97) & US 5843937 A & JP 2000-511893 A & EP 918752 A2	1-15
A	WO 96/23497 A1 (Synphar Laboratories, Inc.) 8.8月.1996 (08.08.96) & US 5502068 A & EP 800390 A1 & JP 11-500427 A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.07.01

国際調査報告の発送日

07.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

胡田 尚則



4 P

7918

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	EP 1083177 A1 (Japan Science and Technology Corporation) 14. 3月. 2001 (04. 03. 01) & WO 00/58312 A1 & JP 2000-281679 A	1-15

請求の範囲1に係る発明は、



という一般式で表される化合物に関するものであるが、その構造については、

「BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造」

あるいは、

「AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造」

という、所望の性質により定義されている。

また、リンカーL及びスペーサーXについても、それぞれ、

「A及びBの化学構造を結合させ得る」

「A-L-Bコンポーネントを結合させる」

という性質のみにより規定されている。

さらに、化合物そのものについても、

「DNAの2本鎖をインターストランドクロスリンクすることができる」

という所望の性質による限定がなされている。

そして、請求の範囲1は、上記したような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、上記したような諸性質を有するような化合物は、出願時の技術常識を勘案しても、その範囲を明確には特定できないから、請求の範囲1は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、明細書に具体的に記載されている化合物、すなわち、明細書7ページにおいて化合物7aとして示されている、製造法及び「インターストランドクロスリンク剤」としての性質が確認された化合物について行った。

なお、明細書7ページにおいて化合物7b-dとして示されている化合物については、明細書7頁8行～8頁8行の記載及び第1図の記載よりみて、「DNAの2本鎖をインターストランドクロスリンクすることができる」との性質を有する化合物とは認め難いが、実施例において具体的製造法が開示されていることから、化合物7b-dについても調査の対象とした。

請求の範囲2-7, 9-15についても同様である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)